



INSTITUT FÜR ANGEWANDTE LABORANALYSEN GMBH

First-Yeast PCR Kit

Pichia membranaefaciens

Real-time PCR-Kit zum Nachweis von
Pichia membranaefaciens

real-time PCR-Kit for detection of
Pichia membranaefaciens

Art.Nr.: TPYPM 0050

Version 11/16

GEN-IAL GmbH
Tel: 02241 2522980
Fax: 02241 2522989
info@gen-ial.de
www.gen-ial.de

First-Yeast PCR Kit

Pichia membranaefaciens

Art. Nr.: TPYPM 0050

(Version 11/16)

1. Verwendungszweck

Nachweis von *Pichia membranaefaciens* in Getränken durch die real-time PCR (Polymerase Kettenreaktion) Methode.

2. Testprinzip

Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzmessung durch das Hydrolysesonden-format (TaqMan®) in weniger als zwei Stunden. Durch *hot-start*-PCR plus einer doppelt markierten sequenzspezifischen Sonde wird bei korrekter Hybridisierung an die Zielsequenz in der Extensions-Phase ein meßbares *Fluoreszenzsignal* definierter Wellenlänge emittiert und bei 518 nm (FAM-Kanal) gemessen. Die PCR-Systeme enthalten dUTP, das bei der Elongation zum Teil das dTTP ersetzt. Optional: Die Verwendung von Uracil-N-Glycosylase (UNG) eliminiert alle dUMP enthaltenden Amplikons, die aus eventuellen Kontaminationen früherer PCRs stammen könnten. (Das UNG Enzym ist in diesem Kit nicht enthalten).

3. Packungsinhalt

Mit den Reagenzien einer Packung können 50 Bestimmungen durchgeführt werden.

Jeder Kit enthält:

1 x Premix TPYPM	weißer Deckel
1 x TPYPM mix (lyophilisiert)	dunkles Gefäß, roter Deckel
1 x ddH ₂ O (zur Aufnahme der lyophilisierten Reagenzien)	farbloser Deckel
1 x Control-DNA (<i>P. membranaefaciens</i> , lyophilisiert)	gelber Deckel

4. Lagerungsbedingungen

Der TPYPM mix und die Control-DNA werden lyophilisiert geliefert und sind in dieser Form bei korrekter Lagerung mindestens 6 Monate haltbar.

Sie müssen vor Gebrauch in dd H₂O gelöst werden (siehe Punkt 6.1).

Die lyophilisierten PCR Reagenzien bei 4 – 8 °C lagern, den Premix bei – 20 °C.

Der TPYPM mix (roter Verschluss) enthält die fluoreszenzmarkierten Sonden und ist deshalb lichtempfindlich. Aus diesem Grund sollte er nicht unnötigem Lichteinfall ausgesetzt werden.

Die rückgelösten Reagenzien (TPYPM mix, Control-DNA) sind bei 4 – 8 °C 4 Wochen stabil.

Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden. Wenn der PCR Kit über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden soll, können diese Reagenzien direkt nach dem Rücklösen aliquotiert und eingefroren werden (-20°C). Die gefrorenen Aliquots sind 6 Monate haltbar.

5. Zusätzlich erforderliches Material

5.1. Geräte

Realtime PCR Gerät mit wenigstens FAM-Kanal

Laborzentrifuge passend für 1,5 – 2,0 ml Reaktionsgefäße

Pipetten für die PCR: 0,5 – 1000 µL

„Vortex“

5.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

steriles, doppelt-destilliertes oder deionisiertes Wasser (ddH₂O)

sterile Reaktionsgefäße 1,5 – 2,0 ml

sterile PCR-Reaktionsgefäße passend zum verwendeten Gerät

passende, sterile Filterspitzen (Filtertips)

optional: Uracil N-Glycosylase (0,01 U/µL PCR-Reaktion)

6. PCR

6.1. PCR-Ansatz

Vorbereitung

Vor der ersten Benutzung müssen alle lyophilisierten Komponenten kurz zentrifugiert und in ddH₂O gelöst werden:

- den lyophilisierten TPYPM mix in 80 µL ddH₂O aufnehmen
- die lyophilisierte Control-DNA in 55 µL ddH₂O aufnehmen
- 15 Minuten lösen, dann gut mischen.

Alle PCR Komponenten vor Gebrauch gut mischen und kurz abzentrifugieren.

Für einen PCR Lauf werden die Anzahl der Proben und die der Kontrollen (Extraktionskontrollen, PCR-Positivkontrolle, PCR-Negativkontrolle) addiert.

PCR-Ansatz pro Probe:

PCR-Komponenten	Menge (µL)
Premix	13,5
TPYPM mix (in ddH ₂ O aufgenommen)	1,5
Proben-DNA	bis 5,0
ddH ₂ O	ad 20 µL
Gesamtvolumen	20,0

- den **Mastermix** aus Premix und TPYPM mix herstellen
- multipliziere die oben angegebenen Volumina mit der Anzahl PCR-Reaktionsansätze, inklusive aller Kontrollen (Positivkontrolle, Negativkontrolle, Extraktionskontrolle), unter Berücksichtigung einer Pipettierreserve von ca. 5-10%
- 15 µL Mastermix in die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße aufteilen
- 1-5 µL Proben-DNA zu den vorbereiteten PCR Gefäßen geben und gegebenenfalls mit ddH₂O auf 5 µL ergänzen; für die PCR-Positivkontrolle 5 µL Control-DNA, für die Extraktionskontrollen 5 µL DNA und für die PCR-Negativkontrolle 5 µL steriles ddH₂O (Pipettenspitzen unbedingt nach jeder Probe wechseln)
- die Reaktionsgefäße verschließen, eventuell zentrifugieren und in das PCR-Gerät setzen.

Zügig arbeiten, Lichteinfall und Erwärmung der Ansätze vermeiden.

6.2 PCR-Programm

Anmerkung:

Für die Verwendung von UNG müssen die Programme entsprechend der Herstellerangaben geändert werden.

6.2.1 Real-time Cycler mit optischen Plastikgefäßen oder 96-well Platten

Anmerkung: Im Premix befindet sich kein Farbstoff zur Normalisierung des Fluoreszenzsignals. Dies muss bei der Einstellung der gerätespezifischen Software vor dem Lauf berücksichtigt werden.

Optional: UNG-Inkubation nach Angaben des Herstellers

Step	Time	Temp.	Acquisition Mode	Status
Initial denaturation of DNA	10 min	95 °C	none	Hold
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	none	Cycle 35 - 40
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	60 °C	single	
Cooling	15 sec	40 °C	none	Hold

6.2.2 LightCycler™

1. Optional Experiment: UNG-Inkubation nach Angaben des Herstellers

2. Experiment: Initial denaturation
Analysis Mode: None

Cycles: 1

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20.00	None

3. Experiment: Amplification

Analysis Mode: Quantification

Cycles: 35 - 45

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
94	00:00:05	20.00	None
60	00:00:25	20.00	Single

4. Experiment: Cool
Analysis Mode: None

Cycles: 1

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20.00	None

7. Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die Auswertung wird entsprechend der für das real-time PCR-Gerät verwendeten Software durchgeführt (siehe Herstellerangaben). Falls die automatische Datenanalyse nicht zufriedenstellend ist, kann die threshold manuell über die Hintergrundfluoreszenz gehoben werden.

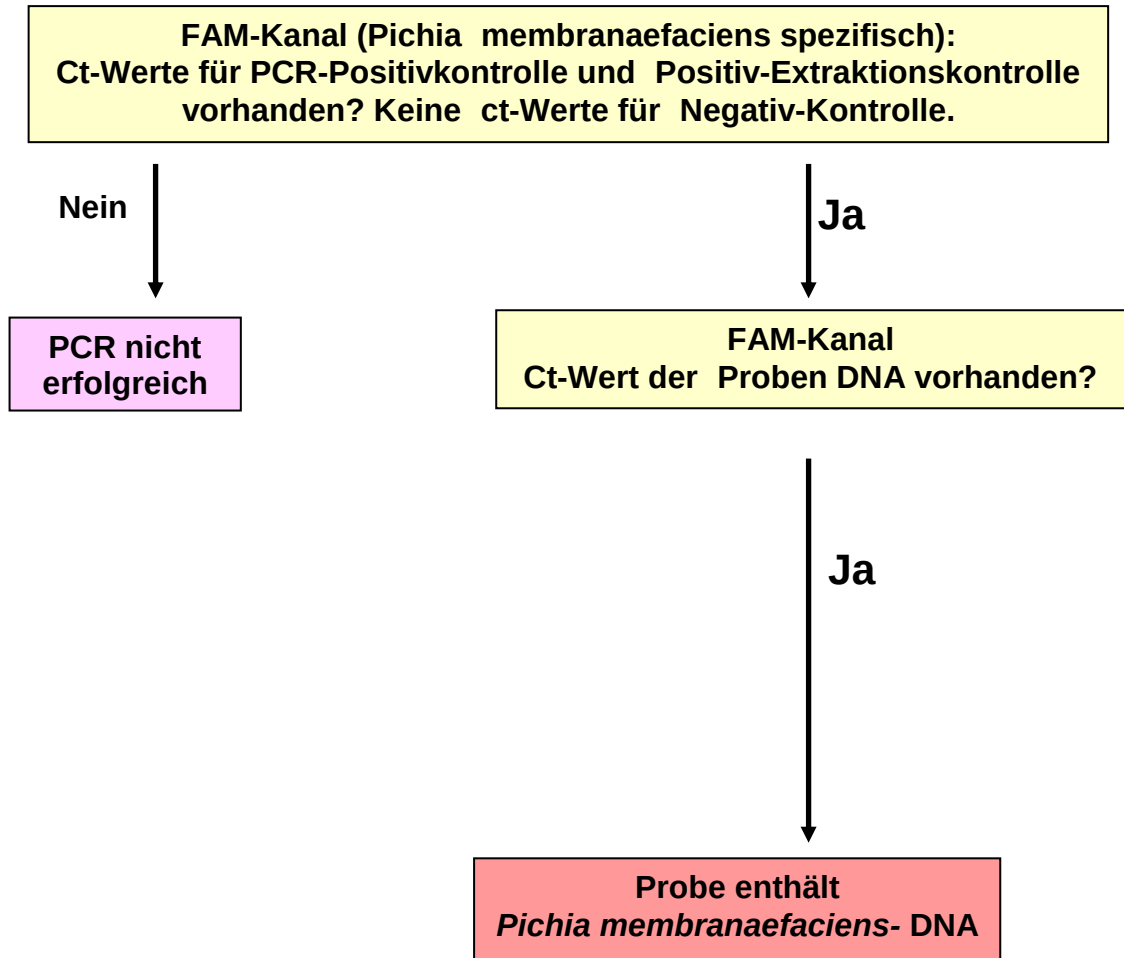
Das für *Pichia membranaefaciens* spezifische Signal wird:

im für den Farbstoff FAM kalibrierten Kanal bei 518 nm (Rotor-Gene™ 510 nm; LC 2.0 530 nm) detektiert.

Eine Probe wird als positiv bewertet, wenn der Ansatz der Probe im FAM/530 nm Kanal positiv ist und die Negativkontrollen negativ sind. Die Positivkontrollen müssen positiv sein.

Eine Probe wird als negativ bewertet, wenn der Ansatz der Probe im FAM/530 nm Kanal negativ ist und die PCR-Positivkontrolle gleichzeitig positiv ist. Die PCR-Negativkontrolle muss im FAM/530 nm Kanal negativ sein.

Analysediagramm



Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. GEN-IAL übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

Rechtlicher Hinweis: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist patentrechtlich geschützt und somit lizenzpflichtig. Sie ist im Besitz der Hoffman-La Roche Inc. Diese Produktinformation versteht sich nicht als Autorisierung oder Lizenzierung, die PCR-Methode kommerziell anzuwenden.

First-Yeast PCR Kit

Pichia membranaefaciens

(Version 11/16)

Art. No.: TPYPM 0050

1. Intended use

Detection of *Pichia membranaefaciens* in beverages by real-time PCR.

2. Test principle

The real-time PCR is based on hot-start-PCR and sequence-specific dual labelled probes (TaqMan®), which, when accurately hybridised, emit a measurable fluorescent signal of a defined wavelength in the extension phase. The increase of signal is continuously measured in a real-time PCR detection instrument.

The kit contains one specific system for the detection of *Pichia membranaefaciens*. The system emits a maximum fluorescent signal at 518 nm (FAM-channel) and contains dUTP. Optional: the use of Uracil-N-Glycosylase will eliminate any contamination with Uracil containing amplicons from former PCRs (the enzyme is not part of this kit).

3. Kit contents

The kit contains sufficient reagents for 50 PCR reactions.

1 x Premix TPYPM	white cap
1 x TPYPM mix (freeze-dried)	dark vial, red cap
1 x ddH ₂ O (for solving dried reagents)	colourless cap
1 x Control-DNA (<i>P. membranaefaciens</i> , freeze-dried)	yellow cap

4. Storage conditions

The TPYPM mix and the Control-DNA are freeze-dried, they have to be solved in ddH₂O prior to use (see 6.1).

All freeze-dried reagents should be stored cool at 4 – 8 °C (35 – 46 °F), the Premix at – 20 °C (– 4 °F).

Once the freeze-dried reagents are dissolved they are stable for 4 weeks at 4 – 8°C (35 – 46 °F) or up to 6 months at –20 °C (–4 °F). Prevent freeze/thaw cycles. Prepare aliquots, if the PCR kit should be used for a longer period than 4 weeks. Frozen aliquots (–20°C) (–4°F) are stable for 6 months.

The TPYPM mix (red cap) contains the fluorescent labelled probe and should be handled light protected.

5. Materials required, but not provided

5.1. Instruments

Realtime PCR instrument with at least FAM-channel
Standard benchtop mini-centrifuge (1.5 – 2.0 mL vials)
Pipettes for 0.5 – 1000 µL
“Vortex”

5.2. Reagents and plastic ware

sterile ddH₂O
sterile reaction vessels 1.5 – 2.0 mL
sterile optical tubes (plastic) or glass capillaries (LightCycler™)
sterile filter tips
optional: Uracil N-Glycosylase (0.01 U/µL added to the PCR reaction mix)

6. PCR

6.1. PCR-Setup

Preparations before first use:

If you use the kit for the first time, the freeze-dried kit components have to be shortly centrifuged and carefully resolved:

- add 80 µL sterile ddH₂O to freeze-dried TPYPM mix
- add 55 µL sterile ddH₂O to the freeze-dried Control-DNA
- after 15 minutes mix well

Before every use thoroughly mix all PCR components and centrifuge briefly.

PCR-reaction per sample:

PCR-components	amount (µL)
Premix TPYPM	13.5
TPYPM mix (dissolved in ddH ₂ O)	1.5
Sample or Control-DNA	up to 5.0
ddH ₂ O	ad. 20
total volume	20.0

Prepare a master mix by mixing Premix and TPYPM mix

1. Multiply said volumes with the number of PCR preparations including controls (positive control, negative control, extraction control), taking into account pipette reserves of approximately 5-10 %.
2. Divide 15 µL of the PCR-master mix among the individual reaction vessels, making sure that, prior to the first filling, the tip of the pipette has been moistened.
3. Add the sample DNA using a fresh tip with each DNA filling and mix it with the master mix at the same time, (with DNA volume less than 5 µL add ddH₂O to the end volume of 20 µL per reaction). Add 5 µL of the Control-DNA and 5 µL of ddH₂O for the negative control reaction.
4. Close the tubes immediately and centrifuge them according to the recommendations of the real-time PCR instrument manual.
5. Place tubes/plate/capillaries into the thermo block/carousel of the instrument, close lid and start run.

Work swiftly to avoid warming up and keep away from light.

6.2 PCR-Programme

Note:

For the use of UNG the thermal cycler programmes have to be changed according to manufacturers' instructions.

6.2.1 Real-time instruments using optical tubes or 96-well plates

The Premix contains no dye for normalising the fluorescence signal

Step	Time	Temp.	Acquisition Mode	Status
Initial denaturation of DNA	10 min	95 °C	none	Hold
Cycling Denaturation	15 sec	95 °C	none	Cycle 35 - 40
Cycling Annealing/ Elongation	30 sec	60 °C	single	
Cooling	15 sec	40 °C	none	Hold

6.2.2 LightCycler™

2. Optional Experiment: UNG-Inkubation nach Angaben des Herstellers

2. Experiment: Initial denaturation

Analysis Mode: None

Cycles: 1

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
95	00:10:00	20.00	None

3. Experiment: Amplification

Analysis Mode: Quantification

Cycles: 35 - 40

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
94	00:00:05	20.00	None
60	00:00:25	20.00	Single

4. Experiment: Cool

Analysis Mode: None

Cycles: 1

Target Temperature (°C)	Incubation Time (hrs:min:sec)	Temperature Transition Rate (°C/s)	Acquisition Mode
40	00:00:30	20.00	None

7. Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the data analysis programme recommended by the real-time instrument manufacturer. If the automatic data analysis of the completed run is not satisfying, the threshold can be adjusted manually above the background signals.

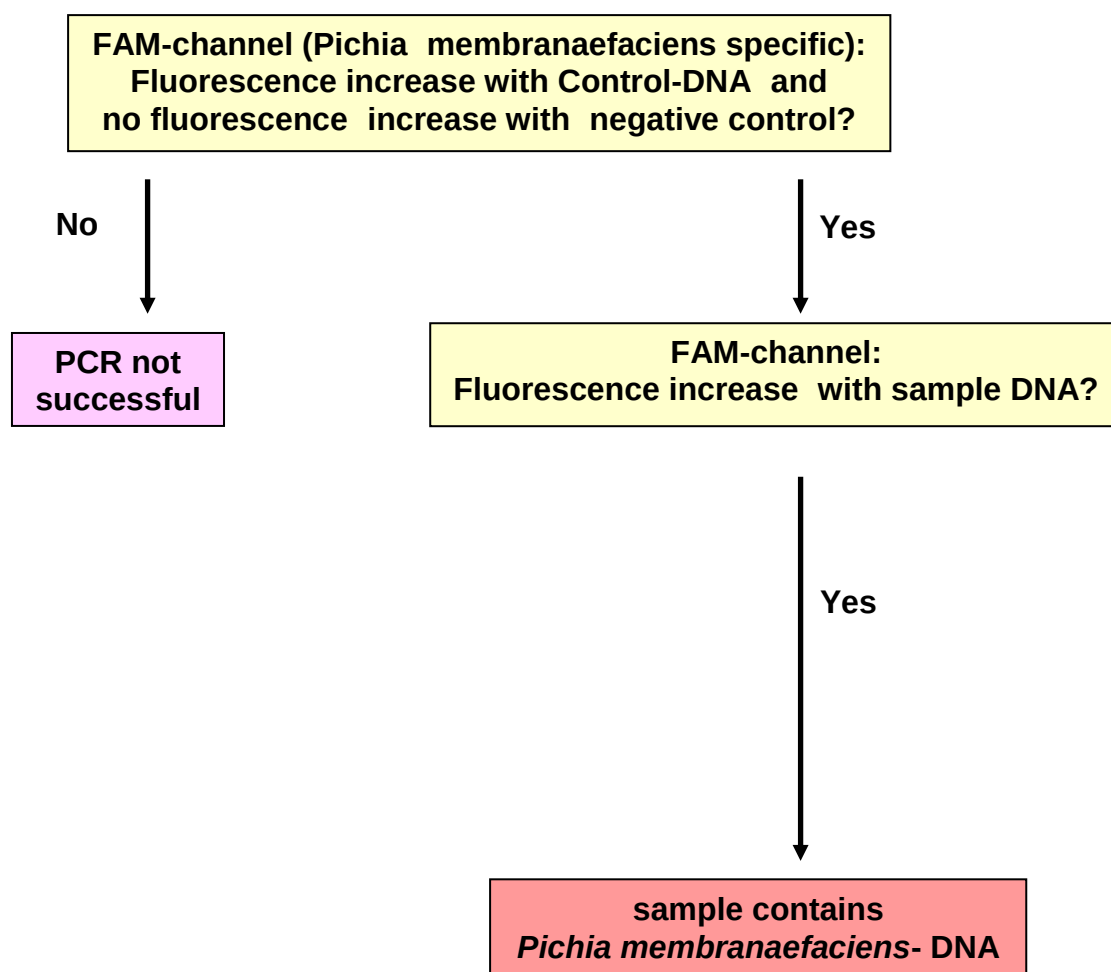
The *Pichia membranaefaciens* specific signal is measured at:

FAM calibrated channel at 518 nm (in a Rotor-Gene™ channel 520 nm, in a LightCycler™ 2.0 channel 530 nm)

A sample is positive, if there is a detectable fluorescence increase in the FAM/530 nm channel and the negative controls show no amplification. The positive controls should have a positive fluorescence signal.

A sample is negative, if there is no detectable fluorescence increase in the FAM/530 nm channel and the positive controls have a positive fluorescence signal. The negative controls show no amplification in FAM e.g. 530 channel.

analysis flowchart



Note:

The polymerase-chain reaction (PCR) is protected by patents and requires a licence from Hoffmann-LaRoche Inc.. The provided product does not authorise the purchaser for the commercial use of this method.

GEN-IAL makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, GEN-IAL will provide a replacement product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. GEN-IAL shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

For research purposes only.